Zur Messung der Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten II.

Von Eduard Stadelmann

Aus dem Botanischen Institut der Universität Innsbruck

Mit 5 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 5. Juni 1952)

II. Die experimentelle Prüfung des Permeabilitätsmaßes K.

I. Einleitung.

Im ersten Teil dieser Arbeit (Stadelmann 1952) wurde ausgehend vom Fickschen Diffusionsgesetz, die Gleichung

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}}{\left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot (t_2 - t_1)} \quad [2] \qquad (7) [1]$$

zur quantitativen Bestimmung der Protoplasmadurchlässigkeit aus Permeabilitätsversuchen nach dem Totalverfahren berechnet und aus ihr zwei Forderungen für den Rückdehnungsverlauf abgeleitet: Die Zeitproportionalität (l. c., p. 782) und Konzentrationsabhängigkeit der Rückdehnung (l. c., p. 783). Es ist hier nun zu zeigen, wie

Die Nummern der Gleichungen sind aus dem ersten Teil dieser Arbeit übernommen.

[2] Darin bedeutet:

b die innere Breite der Zelle in cm;

K Maß für die Protoplastenpermeabilität in cm/sec;

L_0 die nach einer der beiden Methoden für einen Plasmolyseversuch in isotonischer Außenlösung ermittelte Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe in cm;

L_1 bzw. L_2 Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe zur Zeit t_1 bzw. t_2 in cm;

t_1 und t_2 die Zeiten der Messung in sec.

weit diese Forderungen experimentell bestätigt werden, woraus sich auf die allgemeine Zulässigkeit des Faktors K als Maß für die Protoplasmapermeabilität urteilen läßt.

2. Methodik der Versuche.

Zu den Versuchen wurde eine Durchströmungskammer (Stadelmann 1951 b) benutzt, so daß stets ein definiertes Milieu vorhanden war und die Zellen auch während des Wechsels der Milieuflüssigkeiten beobachtbar blieben.

Als Objekte dienten hauptsächlich *Taraxacum officinale* (bereits mehrfach zu Permeabilitätsuntersuchungen herangezogen: Hofmeister 1935, Schmidt 1936, Kreuz 1941, Rottenburg 1944, Collander 1949, Url 1951) und während des Fehlens dieses Freilandmaterials *Sonchus laciniatus* und *Sonchus fruticosus* aus dem Gewächshaus, wobei die Epidermiszellen der Blattrippenoberseite untersucht wurden. Einige Versuche waren mit *Allium cepa* (Außen- und Innenepidermis der Zwiebelschuppe) und *Zebrina pendula* (Epidermis- und Parenchymzellen an Stengellängsschnitten) ausgeführt. Die Schnitte wurden bei den meisten Versuchen unmittelbar nach ihrer Herstellung in einen Tropfen Leitungswasser in den Objektraum der Durchströmungskammer gelegt. Nur einzelne Schnitte kamen zur Wässerung vorher in ein Fläschchen mit destilliertem Wasser.

Die Lösungen waren auf etwa fünf Prozent genau und wurden für jeden Versuch frisch hergestellt. Von den benutzten Reagenzien war Harnstoff chemisch rein, während die anderen chemisch reinst verwendet wurden. Die Konzentrationen lagen zwischen 0,7 mol/Lit und 1,3 mol/Lit und waren so gewählt, daß noch eine ausreichend starke Kontraktion entstand, um die Rückdehnung genügend lang zu protokollieren.

Wird der Schnitt zur Bestimmung von L_0 (vgl. unten) vorplasmolysiert, so beschickt man die Durchströmungskammer zunächst mit dem Plasmolytikum, mißt an der betreffenden Zelle die Protoplastenlänge L_0 und prüft nach einiger Zeit, ob ihr Wert konstant blieb, was das osmotische Endgleichgewicht anzeigt. Hernach leitet man die Lösung des Diosmotikums ein und beginnt so mit dem eigentlichen Permeabilitätsversuch. In geeigneten Zeitabschnitten (etwa 30 sec bis 10 min) werden dann die Protoplastenlängen mittels eines Okularmikrometers gemessen und mit der Zeit der Messung notiert. Berührt eine Plasmakuppe die Zellquerwand und wird von dieser deformiert, so bricht man einen solchen, hier als Einfachversuch bezeichneten Versuch, ab.

Durch die Anwendung der Durchströmungskammer entstehen beträchtliche technische Erleichterungen, und es läßt sich ein Einfachversuch in zahlreichen Varianten abändern, von welchen hier zwei angewandt wurden:

Beim Mehrfachversuch werden an der gleichen Zelle nacheinander zwei oder auch mehrere Permeabilitätsversuche mit demselben Diosmotikum ausgeführt und bei diesen wahlweise entweder die gleiche oder verschiedene Konzentrationen benutzt. Dabei muß vorerst das während des jeweils vorangegangenen Permeabilitätsversuches eingedrungene Diosmotikum aus der Vakuole exosmieren. Dies geschieht, sobald das Diosmotikum im Außenmedium in einer niedrigeren Konzentration vorliegt als in der Vakuole. Soll dem Zellsaftraum die gesamte eingedrungene Diosmotikummenge wieder entzogen werden, darf die Außenlösung kein Diosmotikum enthalten. An sich wäre hiezu schon reines Wasser ausreichend, doch wurde

zur Schonung des Protoplasten vor osmotischen Druckunterschieden meist eine äquimolare Glukoselösung gewählt. Der Protoplast kontrahiert sich wieder, und die Exosmose[3] gilt als beendet, sobald sich innerhalb genügend langer Zeitabstände die Protoplastenlänge L nicht mehr merklich ändert; die Vakuole befindet sich dann hinsichtlich der Gesamtmenge der osmotisch wirksamen Substanz wieder im Anfangszustand, was durch die Bestimmung der Menge m_u nach der Formel $m_u = \frac{\pi b^2}{4} \cdot C \cdot \left(L_o - \frac{b}{3}\right)$ und den Vergleich des Wertes von L mit jenem von L_o überprüfbar ist. Nun wird der neue Permeabilitätsversuch durch Einleitung des Diosmotikums begonnen. Ist dieses mit der Glukoselösung äquimolar, schließt unmittelbar die Rückdehnung an. Bei Konzentrationsverschiedenheit liegt noch, je nachdem, ob die zweite Konzentration stärker oder schwächer ist, eine Art partieller Plasmolyse oder Deplasmolyse dazwischen, bis das neue osmotische Gleichgewicht entsteht. Nach einer solchen zweiten Rückdehnung kann durch Exosmose das Diosmotikum wieder aus der Vakuole entfernt werden, eine dritte Rückdehnung anschließen usf.

Der Doppelversuch setzt sich zusammen aus zwei Einfachversuchen mit voneinander verschiedenen Konzentrationen ohne dazwischenliegender Exosmose. Um die Rückdehnung beim zweiten Versuch noch beobachten zu können, bricht man den ersten ab, sobald er hinreichend lang protokolliert wurde und leitet sofort die zweite Konzentration durch den Objektraum der Durchströmungskammer. Bei Konzentrationserhöhung wird durch die zunächst einsetzende partielle Plasmolyse der Abstand zwischen Plasmakuppen und Querwand vergrößert, während er bei Konzentrationserniedrigung durch die Deplasmolyse verringert wird. Für eine ausreichende Beobachtung des zweiten Teilversuches ist demnach ein Wechsel auf eine höhere Konzentration vorteilhafter.

3. Die Zeitproportionalität der Rückdehnung.

Die Rückdehnung wurde an mehreren Objekten sowie bei verschiedenen Konzentrationen von Harnstoff und Glyzerin untersucht, um das allgemeine Auftreten der Zeitproportionalität deutlich zu erkennen. Insgesamt waren 55 Einfachversuche, 34 Mehrfachversuche (bei vier von diesen unterblieb die Messung der ersten Rückdehnung) und sieben Doppelversuche ausgeführt worden. Bei den beiden letzteren ist die erste Rückdehnung den Einfachversuchen gleichwertig, so daß 92 erste Rückdehnungen zur Beurteilung vorliegen[4]. Als Beispiel soll das folgende Protokoll zeigen, wie durch zahlreiche Einzelmessungen die Änderungen der Protoplastenlängen aufgenommen wurden, um den Rückdehnungsverlauf möglichst genau zu erkennen.

Permeabilitätsversuch V 37; 12. 9. 1946;

Objekt: Zebrina pendula. Längsschnitt an einem Internodium, gemessen

[3] Die Ableitung eines Maßes für die Exosmose und seine experimentelle Anwendung bleibt einer späteren Arbeit vorbehalten.

[4] Ausführliche Details über Versuchsmaterial und Diosmotikum sind bei Stadelmann 1951 a, p. 68 ff., ersichtlich.

wurde je eine anthokyanhaltige und eine anthokyanfreie Zelle der Epidermis. Das Lumen war stark genähert zylindrisch.

Vorbehandlung: Der Schnitt lag vor dem Einbringen in die Glukoselösung etwa 24 Stunden lang in Aqua dest. Nach dieser Wässerung lag der Schnitt dann 31 min lang in der 0,5-molaren Glukoselösung, währenddessen an einigen Zellen der osmotische Grundwert bestimmt wurde.

Lösungen: 0,5 mol Glukose, wasserfrei zu 1000 ccm Aqua dest. 0,5 mol Harnstoff pur. zu 1000 ccm Aqua dest.

Objektiv 7, Okular 4; $1' = 2{,}78\ \mu$;

1. Teilversuch: Bestimmung des osmotischen Grundwertes von drei Zellen:

Zelle 1: h = 90,5 — 37,0 = 53,5′
L = 73,0 — 53,0 = 20,0′
b = 66,0 — 53,0 = 13,0′
Zelle 2: h = 90,0 — 47,0 = 43,0′
L = 76,8 — 58,0 = 18,8′
b = 54,0 — 40,0 = 14,0′
Zelle 3: h = 47,0 — 05,0 = 42,0′
L = 34,2 — 16,8 = 17,4′
b = wie oben = 14,0′

2. Teilversuch: Rückdehnung in der Harnstofflösung.

Gemessen wurde diese an Zelle 2 und 3 gleichzeitig, da beide Zellen mit einer Querwand aneinandergrenzten. Zelle 2 ist anthokyanhaltig und Zelle 3 anthokyanfrei.

TZ[5]: etwa 1 sec—1;
00′00″: Wechsel auf die Harnstofflösung.
00′45″: Die Kuppen schrumpfen noch etwas zusammen.

Zeit	Zelle 2[6]			Zelle 3[6]			
01′ 00″	75,0	58,0	17,0	33,0	16,1	16,9	Kuppen wieder schön
01′ 30″	75,2	57,8	17,4	33,0	16,0	17,0	
02′ 00″	75,7	58,0	17,7	33,2	15,8	17,4	
02′ 30″	76,0	58,0	18,0	33,3	15,6	17,7	
03′ 00″	76,0	58,0	18,0	33,3	15,3	18,0	
03′ 30″	76,1	58,0	18,1	33,3	15,2	18,1	
04′ 00″	76,4	58,0	18,4	33,3	15,2	18,1	
04′ 30″	76,7	58,0	18,7	33,3	15,1	18,2	
05′ 00″	76,8	58,0	18,8	33,3	15,0	18,3	
05′ 30″	77,0	58,0	19,0	33,3	15,0	18,3	
06′ 00″	77,0	58,0	19,0	33,3	15,0	18,3	
07′ 00″	77,0	58,0	19,0	33,3	15,0	18,3	
08′ 00″	77,0	58,0	19.0	33,3	15,0	18,3	

[5] TZ bedeutet „Tropfenzahl“, d. h. die Anzahl der Tropfen pro Sekunde, die vom Ableitungsrohr (vgl. Stadelmann 1951 b, p. 622) in die Saugflasche fallen. Sie ist ein Maß für die Strömungsgeschwindigkeit der Milieuflüssigkeit.

[6] Die ersten beiden Zahlenkolonnen geben die abgelesenen Teilstriche (Zehntelteile geschätzt), die letzte als deren Differenz den Wert L der Protoplastenlänge in ′ an.

Zeit	Zelle 2[6]			Zelle 3[6]			
09′ 00″	77,3	58,0	19,3	33,3	14,8	18,5	
10′ 00″	77,5	58,0	19,5	33,3	14,6	18,7	
11′ 00″	77,6	57,9	19,7	33,3	14,7	18,6	
12′ 00″	77,8	57,8	20,0	33,4	14,7	18,7	
13′ 00″	78,0	57,7	20,3	33,6	14,6	19,0	
14′ 00″	78,0	57,7	20,3	33,7	14,6	19,1	
15′ 00″	78,0	57,4	20,6	33,8	14,6	19,2	
16′ 00″	78,1	57,4	20,6	33,8	14,4	19,4	
17′ 00″	78,2	57,3	20,9	33,9	14,3	19,6	
18′ 00″	78,3	57,2	21,1	33,8	14,2	19,6	
19′ 00″	78,4	57,2	21,2	33,8	14,1	19,7	
20′ 00″	78,6	57,1	21,5	33,9	14,1	19,8	
21′ 00″	78,8	57,0	21,8	33,9	14,1	19,8	
22′ 00″	78,8	57,0	21,8	34,0	14,0	20,0	
23′ 00″	78,8	56,9	21,9	34,0	14,0	20,0	
24′ 00″	78,9	56,8	22,1	34,0	14,0	20,0	
25′ 00″	79,0	56,6	22,4	34,0	14.0	20,0	
26′ 00″	79,0	56,4	22,6	34,0	13,9	20,1	
27′ 00″	79,0	56,3	22,7	34,0	13,9	20,1	
28′ 00″	79,0	56,2	22,8	34,0	13,8	20,2	
29′ 00″	79,1	56,0	23,1	34,0	13,7	20,3	
30′ 00″	79,2	56,0	23,2	34,0	13,6	20,4	
32′ 00″	79,3	56,0	23,3	34,0	13,5	20,5	
34′ 00″	79,7	56,0	23,7	34,0	13,3	20,7	
36′ 00″	79,8	55,8	24,0	34,0	13,1	20,9	
38′ 00″	80,0	55,7	24,3	34,0	13,0	21,0	
40′ 00″	80,0	55,4	24,6	34,2	13,0	21,2	
42′ 00″	80,0	55,2	24,8	34,3	13,0	21,3	
44′ 00″	80,1	55,1	25,0	34,6	13,0	21,6	
46′ 00″	80,6	55,0	25,6	34,8	13,0	21,8	
48′ 00″	80,7	55,0	25,7	34,9	13,0	21,9	
50′ 00″	80,9	54,8	26,1	35,0	13,0	22,0	
52′ 00″	80,9	54,2	26,7	35,1	13,0	22,1	Protoplasma von Zelle 2 hat sich nach d. Messung verschoben
54′ 00″	80,9	54.0	26,9	35,2	13,0	22,2	
56′ 00″	80,1	53,2	26,9	35,5	12,8	22,7	
58′ 00″	80,0	53,0	27,0	35,6	12,7	22,9	
60′ 00″	80,0	52,9	27,1	35,8	12,4	23,4	
62′ 00″	80,0	52,7	27,3	35,9	12,3	23,6	
64′ 00″	80,5	52,3	28,2	36,0	12,1	23,9	
66′ 00″	80,7	52,1	28,6	36,0	12,1	23,9	
68′ 00″	81,0	52,0	29.0	36,0	12,0	24,0	
70′ 00″	81,0	52,0	29,0	36,0	12,0	24,0	
72′ 00″	81,0	52,0	29,0	36,0	12,0	24,0	
74′ 00″	81,0	52,0	29,0	36,1	12,0	24,1	
76′ 00″	81,3	51,8	29,5	36,2	12,0	24,2	
78′ 00″	81,6	51,7	29,9	36,4	12,0	24,4	
80′ 00″	81.8	51,4	30,4	36,6	11,9	24,7	
82′ 00″	81,8	51,1	30,7	36,6	11,8	24,8	

[6] Die ersten beiden Zahlenkolonnen geben die abgelesenen Teilstriche (Zehntelteile geschätzt), die letzte als deren Differenz den Wert L der Protoplastenlänge in ′ an.

Zeit	Zelle 2[6]			Zelle 3[6]		
84′ 00″	82,0	51,1	30,9	36,8	11,7	25,1
86′ 00″	82,0	51,0	31,0	37,0	11,5	25,5
88′ 00″	82,0	51,0	31,0	37,0	11,3	25,7
90′ 00″	82,5	50,6	31,9	37,0	11,2	25,8
92′ 00″	82,8	50,3	32,5	37,0	11,1	25,9
94′ 00″	83,0	50,3	32,7	37,3	11,0	26,3
96′ 00″	83,0	50,0	33,0	37,2	11,0	26,2
98′ 00″	83,2	49,8	33,4	37,5	11,0	26,5
100′ 00″	83,1	49,3	33,8	37,4	10,8	26,6
102′ 00″	83,8	49,1	34,7	37,8	10,6	27,2
104′ 00″	83,3	48,0	35,3	37,9	10,2	27,7
106′ 00″	84,0	48,0	36,0	38,0	10,0	28,0
108′ 00″	84,3	48,0	36,3	38,0	10,0	28,0
110′ 00″	84,9	48,0	36,9	38,0	10,0	28,0
112′ 00″	85,0	47,5	37,5	38,2	10,0	28,2
114′ 00″	85,2	47,3	37,9	38,3	9,7	28,6
116′ 00″	rechte Kuppe nicht mehr zu erkennen			38,7	9,4	29,3
118′ 00″				38,8	9,2	29,6
123′ 30″				abgebrochen, da linke Kuppe viell. gequollen		

Mit diesen Meßwerten wird ein Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm (Abschnitt R in Abb. 4 [I. Teil]) gezeichnet und zwischen die einzelnen Punkte eine Gerade (Rückdehnungsgerade) derart gelegt, daß ihre Abweichung von den Meßpunkten ein Minimum ist. Weicht ein größerer Teil des Rückdehnungsverlaufes erheblich von dieser Geraden ab, wird die betreffende Rückdehnung als nicht zeitproportional beurteilt. An Abb. 1 sind sechs solcher Diagramme mit den Rückdehnungsgeraden für Harnstoff und in Abb. 2 vier weitere für Glyzerin wiedergegeben. Die geringfügigen Streuungen der Einzelwerte liegen meist innerhalb der Fehlergrenzen. Nur am Beginn der Protokollierung treten manchmal größere Abweichungen auf: War nämlich die Zelle nicht vorplasmolysiert und bildeten sich die Plasmakuppen genügend rasch aus, so wurde noch das Ende der Kontraktionsphase aufgenommen, und die ersten Werte von L sind noch zu hoch. War die Zelle aber vorplasmolysiert und waren die Lösungen von Plasmolytikum und Diosmotikum nicht isotonisch, so folgte vor der Rückdehnung eine partielle Plasmolyse (Abb. 1 e und Abb. 2 b) oder Deplasmolyse (Abb. 1 d). Bei einzelnen vorplasmolysierten Zellen findet man noch eine durch ungenaue Isotonie nicht erklärbare Kontraktion der Vakuole (Abb. 1 f). Auf diese Erscheinung und auf das

[6] Die ersten beiden Zahlenkolonnen geben die abgelesenen Teilstriche (Zehntelteile geschätzt), die letzte als deren Differenz den Wert L der Protoplastenlänge in ′ an.



Abb. 1. Rückdehnungen in Harnstoff.

Diagramm a: Zebrina pendula, Stengel;
Parenchymzelle; h = 75,5′; b = 23,0′;
Harnstoff 0,5-molar mit Vorplasmolyse in 0,5-molarer Glukose.

Diagramm b: Taraxacum off., Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 24,5′; b = 5,0′;
Harnstoff 1,0-molar ohne Vorbehandlung.

Diagramm c: Taraxacum off., Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 50,0′; b = 9,0′;
Harnstoff 1,3-molar; vorher 15 min gewassert.

Diagramm d: Taraxacum off., Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 46,0′; b = 8,5′;
Harnstoff 1,3-molar mit Vorplasmolyse in 1,3-molarer Glukose.

Diagramm e: Zebrina pendula, Stengel;
Parenchymzelle; h = 44,0′; b = 15,5′;
Harnstoff 0,7-molar mit Vorplasmolyse in 0,7-molarer Glukose.

Diagramm f: Sonchus laciniatus, Blattbasisoberseite;
Epidermiszelle; h = 36,0′; b = 7,5′;
Harnstoff 1,0-molar mit Vorplasmolyse in 1,0-molarer Glukose.

Abszissen: Zeit in Minuten; Ordinaten: Protoplastenlänge in 1′ = 2,78 μ;
h = innere Zellänge; b = innere Zellbreite.

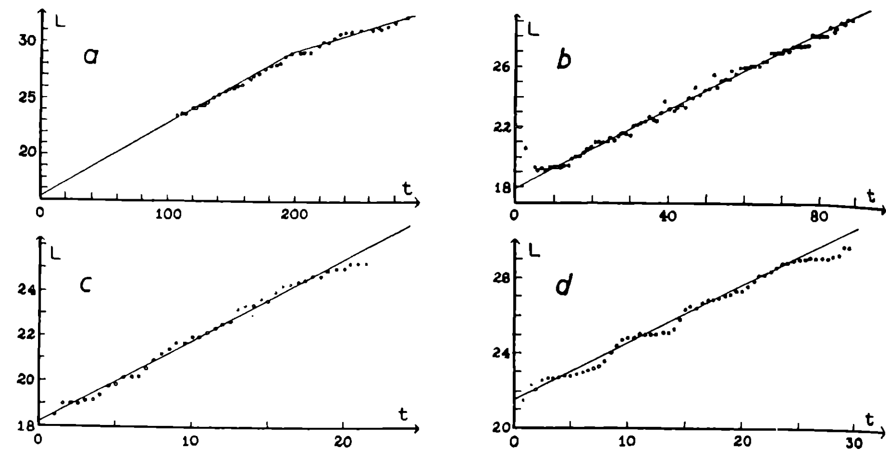


Abb. 2. Rückdehnungen in Glyzerin.

Diagramm a: Allium cepa, Zwiebelschuppe;
Zelle der Außenepidermis; h = 35,5′; b = 13,0′;
Glyzerin 1,6-molar ohne Vorbehandlung.
Diagramm b: Taraxacum off., Blattrippenoberseite:
Epidermiszelle; h = 33,0′; b = 6,7′;
Glyzerin 0,8-molar mit Vorplasmolyse in 0,8-molarer Glukose.
Diagramm c: Taraxacum off., Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 27,5′; b = 4,7′;
Glyzerin 0,8-molar mit Vorplasmolyse in 0,8-molarer Glukose.
Diagramm d: Taraxacum off.. Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 10,7′; b = 3,0′;
Glyzerin 0,8-molar ohne Vorbehandlung.

Abszissen: Zeit in Minuten; Ordinaten: Protoplastenlänge in 1′ = 2.78 μ;
h = innere Zellänge; b = innere Zellbreite.

Vorkommen von Knickungen der Rückdehnungsgeraden (Abb. 2 a) wird später zurückgekommen. Bei der Beurteilung, ob eine Rückdehnung als zeitproportional gelten kann, bleiben daher die Abweichungen am Beginn der Rückdehnungskurve unberücksichtigt. Ebenso werden Rückdehnungen mit einem Knickpunkt als zeitproportional gerechnet, da eine plötzliche Änderung der Rückdehnungsgeschwindigkeit die Zeitproportionalität als solche nicht betrifft. Das Ergebnis ist für die ersten Rückdehnungen (das heißt Einfachversuche und erste Rückdehnungen der Mehrfachversuche) getrennt nach dem Diosmotikum in der Tabelle 1 angegeben, während die Tabelle 2 die Zusammenfassung aller Rückdehnungen der Einfach-, Mehrfach- und Doppelversuche zeigt.

Tabelle 1. Beurteilung der ersten Rückdehnungen.

Diosmotikum	Gesamtzahl der Rückdehnungen	Zahl der nicht zeitproportionalen Rückdehnungen	Zahl der zeitproportionalen Rückdehnungen	Zeitproportional in Prozenten der Gesamtzahl
Harnstoff	86	13	73	85
Glyzerin .	6	1	5	83

Tabelle 2. Gesamtbeurteilung aller Rückdehnungen.

Wievielte Rückdehnung	Gesamtzahl der Rückdehnungen	Nicht zeitproportional	Zeitproportional	Zeitproportional in Prozenten der Gesamtzahl
erste	92	14	78	85
zweite	34	3	31	91
dritte	16	3	13	81
vierte und folgende	10	0	10	100
Summe	152	20	132	87

Wegen dieses hohen Anteils an der Gesamtzahl können die *zeitproportionalen Rückdehnungen für plasmometrierbare Zellen als normal* angesehen werden, womit die erste aus der Formel

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}}{\left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot (t_2 - t_1)}$$

abgeleitete Gesetzmäßigkeit bewiesen erscheint.

4. Die Ermittlung der Permeabilitätskonstanten K.

Zu einer genauen Permeabilitätsmessung sollte der Wert von L so oft bestimmt werden, daß in einem Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm ein normaler Rückdehnungsverlauf erkannt werden

kann. Für größere Versuchsreihen mögen, wie bei den bisherigen Methoden, zwei Messungen von L und t sowie die Bestimmung der Zeit t_o des Versuchsbeginnes genügen; damit wird nach Formel (8) (siehe unten) L_o errechnet und schließlich der Wert von K ermittelt.

Die Bestimmung von L_o erfolgt nach der Extrapolationsmethode (vgl. Stadelmann 1952, p. 776). indem aus der Rückdehnungsgeraden für die Zeit t_o des Einlegens des Schnittes in das Diosmotikum der Wert von L_o abgelesen wird. Da nun die Zeitproportionalität gesichert ist, kann man diese Größe auch rein rechnerisch ermitteln, denn es gilt allgemein:

$$\frac{L_a - L_b}{t_a - t_b} = \text{Const.}$$

Es ist daher auch:

$$\frac{L_1 - L_o}{t_1 - t_o} = \frac{L_2 - L_1}{t_2 - t_1}.$$

Hieraus folgt:

$$L_0 = L_1 - \frac{L_2 - L_1}{t_2 - t_1} \cdot (t_1 - t_o). \qquad (8)$$

Darin bedeutet:

L_1 und L_2 die Protoplastenlänge zur Zeit t_1 und t_2 während der Rückdehnungsphase.

t_o Die Zeit des Beginns des Permeabilitätversuches.

L_o Die extrapolierte Protoplastenlänge von Kuppe zu Kuppe für den Beginn des Permeabilitätsversuches.

Dabei wird der Fehler vernachlässigt, der sich aus den Unterschieden der Protoplastenoberflächen ergibt, wie diese einerseits in der Anfangs- und Kontraktionsphase tatsächlich vorliegen und andererseits bei der Extrapolation angenommen werden. Eine weitere Unsicherheit entsteht möglicherweise aus den isotonischen Koeffizienten, wie sie de Vries (1899) für Harnstoff und Fitting (1919) für Glyzerin und Harnstoff fand und sie nach Hofmeister (1948, p. 86) bei rasch permeierenden Diosmotika allgemein vorkommen. Zum Beispiel würde sich ein in Rohrzucker perfekt plasmolysierter Protoplast in der äquimolaren Harnstofflösung auf 10/9 des früheren Volumens ausdehnen, ohne daß noch Harnstoff permeiert ist. Ob auch zwischen Glukose und Harnstoff der isotonische Koeffizient von eins abweicht, ist nicht bekannt. Da diese Verhältnisse allgemein keineswegs völlig geklärt erscheinen, wären weitere Untersuchungen erwünscht. Findet man dabei die isotonischen Koeffizienten bestätigt, so sind diese bei den extrapolierten Werten von L_o entsprechend zu berücksichtigen,

damit die Beziehungen zwischen Teilchenzahl und Konzentration richtig angewandt werden.

Bei der Methode der Vorplasmolyse gelangt der Schnitt zunächst in eine äquimolare Zuckerlösung (vgl. auch Bogen 1937 ff.), verbleibt darin bis zur perfekten Plasmolyse und kommt erst dann in das Diosmotikum. Damit ist die Anfangs- und Kontraktionsphase bereits übersprungen, und der Protoplast dehnt sich sogleich zurück. Wenn auch nach diesem Verfahren der Wert für L_0 eindeutig bestimmbar ist, bestehen doch Bedenken wegen einer möglichen Herabsetzung der Permeabilität durch die Vorplasmolyse (vgl. Huber und Schmidt 1933, Schmidt 1936), so daß es allgemein günstiger erscheint, der Extrapolationsmethode den Vorzug zu geben.

Als Berechnungsbeispiel für den Faktor K wird der in Abb. 3 dargestellte Doppelversuch mit der Rückdehnung des ersten Teilversuches in 1,0-molarer Harnstofflösung gewählt.

Objekt: *Sonchus laciniatus,* Epidermiszelle der Blattrippenoberseite.

Gemessen wurden: Innere Zellänge $h = 24{,}0'$; Innere Zellbreite $b = 5{,}5'$; $\frac{b}{3} = 1{,}8'$; $\frac{b}{4} = 1{,}4'$.

Es sind zunächst, wie bei den bisherigen Permeabilitätsbestimmungen üblich, die Mikrometerwerte selbst eingesetzt und erst K in cm/sec umgerechnet ($1' = 2{,}78\,\mu$).

L_{01}' wird nach der Extrapolationsmethode aus der interpolierten Rückdehnungsgeraden (vollausgezogene Linie) für $t_{01} = 3$ min 00 sec bestimmt.

$$L_{0_1} = 11{,}7'; \quad L_{0_1} - \frac{b}{3} = 9{,}9';$$

Man wählt nun zwei Zeiten t_{11}, t_{21} und liest die zugehörigen Werte L_{11}, L_{21} auf der Rückdehnungsgeraden ab (vgl. Abb. 3):

$$\begin{array}{llll} t_{11} = 19 \text{ min} = 1140 \text{ sec}; & & & L_{11} = 12{,}4'; \\ t_{21} = 55 \text{ min} = 3300 \text{ sec}; & & & L_{21} = 14{,}1'; \\ \hline t_{21} - t_{11} \quad = 2160 \text{ sec}; & & & L_{21} - L_{11} = 1{,}7'; \end{array}$$

$$\frac{L_{21}}{L_{11}} = 1{,}14; \quad \lg \frac{L_{21}}{L_{11}} = 0{,}0567; \quad \ln \frac{L_{21}}{L_{11}} = 0{,}131; \quad \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_{21}}{L_{11}} = 0{,}24.$$

Das Glied $\frac{b}{3} \ln \frac{L_{21}}{L_{11}}$ beträgt demnach mehr als 10 Prozent der Differenz $L_{21} - L_{11}$ und kann nicht vernachlässigt werden.

Diese Werte in die Gleichung $K_1 = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_{21} - L_{11} - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_{21}}{L_{11}}}{\left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot (t_{21} - t_{11})}$ eingesetzt:

Die zweite Ziffer im Index gibt den Teilversuch an, in welchem die betreffende Größe liegt.

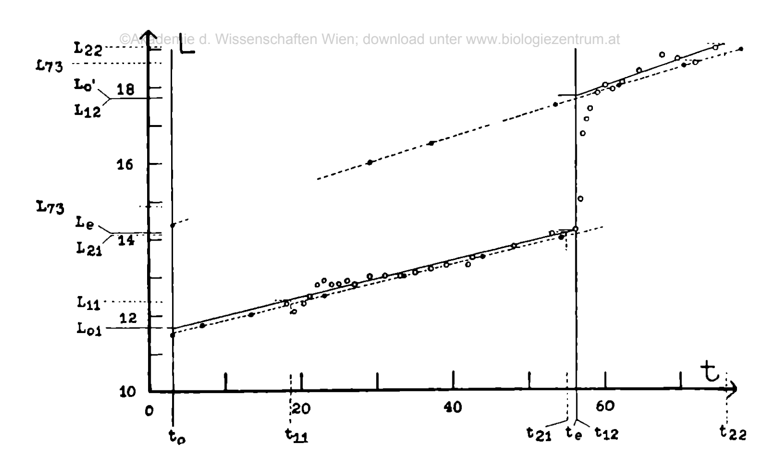


Abb. 3. Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm eines Doppelversuches (Versuch Nr. 90).

Abszisse: Zeit in min.
Ordinate: Protoplastenlänge in (1′ = 2,78 μ).
Diosmotikum: Harnstoff.
Erster Teilversuch (t_0 bis t_e): Konzentration $C_1 = 1{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm.
Zweiter Teilversuch (nach t_e): Konzentration $C_2 = 1{,}0 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm.
—— Nach den Einzelmessungen (∘) der Protoplastenlängen während des Versuches interpolierte Rückdehnungsgerade.
Rückdehnungsgerade interpoliert zwischen den durch Berechnung gefundenen Werten (•) der Protoplastenlänge. Vgl. p. 387 ff.
$t_0 = t_{0_1}$ Anfang des Permeabilitätsversuches = Beginn des ersten Teilversuches.
$t_e = t_{0_2}$ Ende des ersten und Anfang des zweiten Teilversuches.
$L_0 = L_{0_1}$ Für den Beginn des Permeabilitätsversuches extrapolierte Protoplastenlänge.
L_0' = Für den Beginn des zweiten Teilversuches extrapolierte Protoplastenlänge.
L_e = Protoplastenlänge am Ende des ersten Teilversuches.
L_{11}, L_{21}. t_{11}, t_{21} bzw. L_{12}, L_{22}, t_{12}, t_{22} die für die Berechnungen von p. 383 bzw. p. 385 gewählten Wertepaare von L und t.
L_{73} = Protoplastenlänge für t = 73 nach den für beide Konzentrationen berechneten Geraden.

$$K_1 = 1{,}4 \cdot \frac{1{,}7 - 0{,}24}{9{,}2 \cdot 2160} = 1{,}0 \cdot 10^{-4}{}'/\text{sec} = \underline{2{,}8 \cdot 10^{-8}\ \text{cm/sec.}}$$

Der Faktor K besitzt die gleiche Dimension wie eine Geschwindigkeit, und seine Maßeinheit ist im C. G. S.-System ein Zentimeter pro Sekunde (cm/sec). Collander und Bärlund (1933) und Höfler (1934) benutzten als andere Einheit gleicher Dimension ein Zentimeter pro Stunde (cm/h), welche sich demnach um das 3600fache von der C. G. S.-Einheit unterscheidet.

Die Genauigkeit des Zahlenwertes ist abhängig von den in die Bestimmungsgleichung eingesetzten Größen und wird im günstigsten Falle so hoch wie bei dem am wenigsten genau bestimmten Faktor. Obwohl alle Größen auf drei Stellen genau meßbar sind, geht durch die Differenzbildung meist eine Stelle verloren, und K kann nur auf zwei Dezimalstellen berechnet werden.

Die Größe von K ändert sich nur unwesentlich, wenn an derselben Rückdehnungsgeraden andere Wertepaare von t gewählt werden, ist aber stark abhängig von der Steigung (vgl. das Beispiel bei Stadelmann 1951 a). Letzteres hindert aber die Anwendbarkeit von K als Permeabilitätsmaß nicht, da im gleichen Verhältnis auch die Unterschiede der Plasmadurchlässigkeit verstärkt zum Ausdruck kommen.

5. Die Konzentrationsabhängigkeit der Rückdehnung.

Im ersten Teil dieser Arbeit (p. 783) wurde aus der Gleichung (7) abgeleitet, daß die Rückdehnung konzentrationsabhängig ist: Sie soll sich bei Erhöhung der Außenkonzentration derart verlangsamen, daß das Produkt $\left(L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}\right) \cdot C$ für gleiche Zeitabschnitte $(t_2 - t_1)$ konstant bleibt. In beiden Konzentrationen folgt dann für K der gleiche Wert. Um dies zu prüfen, berechnet man getrennt aus den ersten und zweiten Teilversuchen von Doppelversuchen den Faktor K. Am Grad der Übereinstimmung beider Zahlen kann man die Bestätigung des obigen Zusammenhanges beurteilen.

Die Berechnung von K_2 für den zweiten Teilversuch erfolgt analog wie oben für K_1 gezeigt, da sich die Zelle so zurückdehnt, wie wenn sie von vorne herein nur in der Konzentration C_2 gelegen hätte (vgl. p. 396). Dabei ist zu beachten, daß L_0 auf die neue Konzentration umgerechnet wird, da diese Größe ja für einen isotonischen Plasmolyseversuch einzusetzen ist. Die Umrechnung ergibt sich aus der Volums-Konzentrations-Beziehung:

$$\left(Lo_1 - \frac{b}{3}\right) \cdot C_1 = \left(Lo_2 - \frac{b}{3}\right) \cdot C_2.$$

Im obigen Beispiel wurde für den ersten Teilversuch mit der Konzentration $C_1 = 1{,}3$ mol/Lit $Lo_1 - \frac{b}{3} = 9{,}9'$ gefunden.

Für $C_2 = 1{,}0$ mol/Lit ergibt sich demnach $Lo_2 - \frac{b}{3} = 13'$. Wählt man $t_{12} = t_e = 56$ min, $t_{22} = 76$ min, so findet man an der Rückdehnungsgeraden des zweiten Teilversuches (vgl. Abb. 3) $L_{12} = Lo' = 17{,}7'$ und $L_{22} = 19{,}1'$. Mit diesen Werten wird nach Gleichung (7):

$$K_2 = 1{,}4 \cdot \frac{1{,}4 - 0{,}14}{13 \cdot 1200} = 1{,}2.\ 10^{-4\prime}/\text{sec}.$$

Der Unterschied zwischen K_1 und K_2 beträgt hier 20 Prozent.

Bei den sieben Doppelversuchen war für vier Zellen die zweite Konzentration höher als die erste, während bei dreien auf eine schwächere Konzentration gewechselt wurde, wobei dann die Rückdehnung nur in einem Falle ausreichend zu protokollieren war. Es verbleiben somit insgesamt fünf Doppelversuche zur Beurteilung und beträgt bei diesen der Unterschied beider K-Werte höchstens 31% des jeweils ersten Wertes. Erscheint auch die Zahl der geprüften Zellen relativ gering, so zeigt sich doch eine für diese Verhältnisse sehr gute Übereinstimmung, so daß eine unzulässige Vergrößerung des Unterschiedes auch bei weiteren Versuchen nicht zu erwarten ist.

Damit erscheint auch die zweite Gesetzmäßigkeit, die aus der Gleichung (7) folgt, in zunächst beschränktem Umfange experimentell bestätigt.

Eine einfache Kontrolle für die richtige Lage der im zweiten Teilversuch eingetragenen Rückdehnungsgeraden kann durch deren Extrapolation bis zur Zeit t_e (Beginn des zweiten Teilversuches) erfolgen, indem man dort einen Wert L_o' für die Protoplastenlänge bestimmt (vgl. Abb. 3). Aus diesem Wert kann die Gesamtmenge m_u' der osmotisch wirksamen Substanz, die zu diesem Zeitpunkt bei der Außenkonzentration C_2 in der Vakuole vorhanden ist, nach Gleichung (4) ermittelt werden:

$$m_u' = \frac{\pi \cdot b^2}{4} \cdot \left(L_o' - \frac{b}{3}\right) \cdot C_2.$$

Die Gesamtmenge m_u' läßt sich aber andererseits auch am Ende des ersten Teilversuches aus dem Wert L_e und der Konzentration C_1 errechnen: $m_u' = \frac{\pi \cdot b^2}{4} \cdot \left(L_e - \frac{b}{3}\right) \cdot C_1$. Stimmen beide Werte für m_u' überein, so sind auch die Produkte $\left(L_e - \frac{b}{3}\right) \cdot C_1$ und $\left(L_o' - \frac{b}{3}\right) \cdot C_2$ gleich. m_u' ist die Summe der Menge m_u der ursprünglich vorhandenen osmotisch wirksamen Substanz und der während des ersten Teilversuches endosmierten Menge m_s des Diosmotikums, die aus den Gleichungen (4) und (3) folgen: $m_u' = m_u + m_s = C_1 \cdot \left(L_o - \frac{b}{3}\right) \cdot \frac{\pi \cdot b^2}{4} + C_1 \cdot (L_e - L_o) \cdot \frac{\pi \cdot b^2}{4} = C_1 \left(L_e - \frac{b}{3}\right) \cdot \frac{\pi \cdot b^2}{4}$.

Für obiges Berechnungsbeispiel folgt zunächst aus Abb. 3: $L_e = 14{,}2'$; $L_o' = 17{,}7'$ Ferner ist $\frac{b}{3} = 1{,}8'$, $C_1 = 1{,}3$ mol/Lit, $C_2 = 1{,}0$ mol/Lit. Mit diesen Größen zeigt der Wert von $\left(L_e - \frac{b}{3}\right) \cdot C_1$ eine Abweichung von etwa 1 Prozent gegenüber demjenigen von

$\left(L_o' - \frac{b}{3}\right) \cdot C_2$, was eine sehr gute Übereinstimmung kennzeichnet und die Lage der gewählten Rückdehnungsgeraden bestätigt.

Um die Zahlenwerte von m_u, m_s oder m_u' anzugeben, muß L und b zunächst in cm umgerechnet werden; mit $1' = 2{,}78\,\mu$ wird $b = 1{,}5 \cdot 10^{-3}$ cm, $L_o = 32{,}5 \cdot 10^{-4}$ cm und $L_e = 39{,}5 \cdot 10^{-4}$ cm; $C_1 = 1{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm, $C_2 = 1{,}0 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm. Damit wird nach obiger Formel: $m_u = 6{,}4 \cdot 10^{-12}$ mol; $m_s = 1{,}6 \cdot 10^{-12}$ mol. Gibt man letzteren Wert für das benutzte Diosmotikum (Harnstoff, 1 mol = = 60 gr) in Gramm an, so folgt, daß während des ersten Teilversuches 0,000.000.096 Milligramm Harnstoff in die Vakuole permeierten; m_u' ergibt sich als Summe beider Werte zu $8{,}0 \cdot 10^{-12}$ mol. Berechnet man diesen Wert aus dem zweiten Teilversuch mit $L_o' = 49{,}2 \cdot 10^{-4}$ cm, so folgt $m_u' = 7{,}9 \cdot 10^{-12}$ mol, welcher Wert um die bereits oben erwähnte Differenz von 1% vom zuerst errechneten abweicht.

6. Die Berechnung einer Rückdehnungskurve.

Ist bei einer Zelle für ein bestimmtes Diosmotikum der Wert von K ermittelt, die Zellbreite b und die Menge m_u bekannt, so können die Rückdehnungen in verschiedenen Konzentrationen dieses Diosmotikums berechnet werden. Im folgenden Beispiel werden die Daten des Doppelversuches von Abb. 3 benutzt, so daß schließlich die im Versuch gefundene Rückdehnung resultieren soll.

Man geht von der durch eine unbestimmte Integration folgenden Endgleichung aus, die sich mit der Formel (7) ergibt, wenn man dort $L_1 = L_o$, $L_2 = L$, $t_1 = 0$ und $t_2 = t$ setzt:

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L - L_o - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_o}}{\left(L_o - \frac{b}{3}\right) \cdot t}.$$

Diese Gleichung wird nach t aufgelöst und für eine Reihe von angenommenen Werten für L die Zeiten t berechnet:

$$t = \frac{b}{4.\ K.\ \left(L_o - \frac{b}{3}\right)} \cdot \left(L - L_o - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_o}\right).$$

Dabei folgt der Wert für L_o aus der umgeformten Gleichung (4):

$$L_o = \frac{m_u}{C} \cdot \frac{4}{\pi \cdot b^2} + \frac{b}{3}.$$

Die Berechnung soll für die Konzentration $C_1 = 1{,}3000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm und $C_2 = 1{,}0000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm gezeigt werden. Dabei ist

die Genauigkeit der Zahlen willkürlich um zwei bzw. drei Stellen erhöht, damit für die späteren Betrachtungen genügend exakte Werte folgen.

a) Berechnung der Rückdehnung für die Außenkonzentration C_1.

Es ist gegeben: $1' = 2{,}7800 \cdot 10^{-4}$ cm; $m_u = 6{,}4000 \cdot 10^{-12}$ mol; $b = 5{,}5000' = 1{,}5289 \cdot 10^{-3}$ cm; $K = 1{,}0000 \cdot 10^{-4}\,'/\text{sec} = 6{,}0000 \cdot 10^{-3}$ '/min.

Nach obiger Formel folgt zunächst für L_o:

$$L_o = \frac{6{,}4000 \cdot 10^{-12}}{1{,}3000 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{4{,}0000}{3{,}1416 \cdot 2{,}3378 \cdot 10^{-6}} + 0{,}50966 \cdot 10^{-3} =$$
$$= 3{,}1910 \cdot 10^{-3} \text{ cm} = 11{,}479'$$

Die Abweichung dieses Wertes gegenüber dem im Versuch gefundenen (11,7') beträgt etwa 2% und entsteht aus den Rechenoperationen.

Damit wird, wenn man K in '/min und b und L_o in einsetzt, in der obigen Gleichung für t der Quotient

$$\frac{b}{4 \cdot K \cdot \left(L_o - \frac{b}{3}\right)} = 23{,}760 \text{ min}$$

und man bekommt schließlich:

$$t = 23{,}760 \cdot \left(L - L_o - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_o}\right) \text{ min.}$$

Die weitere Berechnung erfolgt in Tabellenform, indem man für L aufeinanderfolgende Werte wählt:

Gewählter Wert von L	$\lg \frac{L}{L_o}$	$\frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_o}$	$L - L_o$	$L - L_o - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_o}$	t
11,479	0,00000	0,00000	0,000	0,000	0,000
11,700	0,00830	0,0350	0,221	0,186	4,42
12,000	0,01929	0,08143	0.521	0,440	10,5
12,500	0,03702	0,1563	1,021	0,865	20,6
13,000	0,05405	0,2282	1,521	1,293	30,72
13,500	0,07044	0,2974	2,021	1,724	40,96
14,000	0,08624	0,3641	2,521	2,157	51,25
14.500	0,10148	0,42839	3,021	2,593	61,61
15,000	0,11620	0,49053	3,521	3,030	72,01

b) Berechnung der Rückdehnung für die Außenkonzentration C_2.

Mit $C_2 = 1{,}0000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm und den übrigen Daten wie oben folgt nach der gleichen Formel $L_0 = 3{,}9954 \cdot 10^{-3}$ cm = 14,372' und damit

$$t = 18{,}277 \cdot \left(L - L_0 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_0}\right) \text{min.}$$

Schließlich wird wieder in Tabellenform weiterberechnet:

Gewählter Wert von L	$\lg \frac{L}{L_0}$	$\frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_0}$	$L - L_0$	$L - L_0 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_0}$	t
14,372	0,00000	0,00000	0,000	0,000	0,000
14,600	0,00683	0,0288	0,228	0,199	3,64
15,000	0,01857	0,07839	0,628	0,550	10,1
15,500	0,03281	0,1385	1,128	0,989	18,1
16,000	0,04660	0,1967	1,628	1,431	26,15
16,500	0,05996	0,2531	2,128	1,875	34,26
17,000	0,07293	0,3079	2,628	2,320	42,40
17,500	0,08552	0,3610	3,128	2,767	50,57
18,000	0,09775	0,4127	3,628	3,215	58,76
18,500	0,10965	0,45970	4,128	3,668	67,04
19,000	0,12123	0,51175	4,628	4,116	75,22
19,500	0,13251	0,55939	5,128	4,569	83,50

Die so ermittelten Werte für beide Rückdehnungsgeraden sind in das Diagramm der Abb. 3 (als Punkte •) eingetragen (wobei beachtet wird, daß $t_0 = 3$ min ist) und ergeben den berechneten Rückdehnungsverlauf (unterbrochene Linie), dessen anfängliche Krümmung (vgl. I. Teil, Abb. 6) bei beiden Konzentrationen kaum noch zu erkennen ist. Seine Abweichungen von dem im Versuch beobachteten Rückdehnungsverlauf sind sehr gering, und die Kurven für $C_2 = 1{,}0000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm stimmen nicht nur in ihrer Steilheit, sondern sogar in ihrer Lage überein, was auf p. 396 ff. noch zu diskutieren ist.

7. Die Menge und Partialkonzentration des Diosmotikums berechnet für aufeinanderfolgende Zeitintervalle.

Zur eingehenderen Analyse der Rückdehnung sollen zunächst die folgenden Größen für gleich lange Zeitintervalle aus dem berechneten Verlauf ermittelt werden:

Dm_s, die während des Intervalls Dt in die Vakuole permeierte Substanzmenge in mol/Intervall;

m_s, die Gesamtmenge des Diosmotikums, die in der Vakuole am Ende des Intervalls vorhanden ist, in mol;

z_m, die pro Einheit der Protoplastenoberfläche während eines Intervalls Dt permeierte mittlere Menge in mol/qcm-Intervall;

k_e, die Partialkonzentration des Diosmotikums in der Vakuole am Ende des Intervalls in mol/ccm.

Man teilt die Zeit von t = 3 min (Beginn der Rückdehnung) bis t = 73 min in sieben Intervalle von je 10 Minuten Dauer. Um die L-Werte für das Ende bzw. den Anfang der Intervalle genauer anzugeben, wird nur L_{73} aus dem Diagramm der Abb. 3 abgelesen. Wenn man unter Vernachlässigung der Anfangskrümmung den Rückdehnungsverlauf als ideal zeitproportional auffaßt, kann man den siebenten Teil der Differenz L_{73}—L_3 als die Zunahme der Protoplastenlänge L pro Intervall betrachten:

	für $C_1 = 1{,}3000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm		für $C_2 = 1{,}0000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm	
L_{73}	14,90′ = 4,142	10^{-3} cm	18,67′ = 5,191	10^{-3} cm
L_3 (= L_0 von p. 16 bzw. 17)	11,48′ = 3,191	10^{-3} cm	14,37′ = 3,995	10^{-3} cm
$L_{73} - L_3$	3,42′ = 0,951	10^{-3} cm	4,30′ = 1,196	10^{-3} cm
Zunahme von L pro Intervall	0,489′ = $0{,}135_9$	10^{-3} cm	0,614′ = 0,1708 .	10^{-3} cm

Als Beispiel wird nun die Berechnung obiger Größen für das erste Intervall bei C_1 gezeigt. Abschließend sind diese Zahlenwerte für alle Intervalle in zwei Tabellen zusammengefaßt.

Dm_s wird nach Gleichung (3) ermittelt: $Dm_s = \pi \cdot \frac{b^2}{4} \cdot C \cdot (L_2 - L_1)$; dabei ist $(L_2 - L_1)$ die oben errechnete Zunahme von L. Mit $b = 1{,}529 \cdot 10^{-3}$ cm; $C = C_1 = 1{,}3000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm und $(L_2 - L_1) = 0{,}135_9 \cdot 10^{-3}$ cm wird schließlich $Dm_s = 3{,}24_4 \cdot 10^{-13}$ mol/Intervall.

m_s erhält man durch Summierung der Dm_s-Werte der einzelnen Intervalle bis einschließlich des betrachteten. Beim ersten Intervall ist m_s gleich Dm_s: $m_s = 3{,}24_4 \cdot 10^{-13}$ mol.

z_m ergibt sich aus Dm_s und der mittleren Protoplastenoberfläche q_m: $z_m = \frac{Dm_s}{q_m}$, dabei ist $q_m = \frac{q_1 - q_2}{2}$ und wird nach Gleichung (6) aus den L-Werten am Beginn und Ende des Intervalls berechnet: $q_m = \pi \cdot b \cdot \frac{L_1 + L_2}{2}$;

für das erste Intervall wird $\frac{L_1 + L_2}{2} = 3{,}259 \cdot 10^{-3}$ cm. Setzt man für $Dm_s =$ $= 3{,}24_4 \cdot 10^{-13}$ mol, so wird: $z_m = 2{,}07_2 \cdot 10^{-8}$ mol/qcm · Intervall.

k_e errechnet sich aus m_s und V_e, dem Vakuolenvolumen am Ende des betrachteten Intervalls: $k_e = \frac{m_s}{V_e}$; dabei gilt wieder (vgl. I. Teil, p. 775 oben): $V_e = \pi \cdot \frac{b^2}{4} \cdot \left(L_e - \frac{b}{3}\right)$; Am Ende des ersten Intervalls wird für $L_e =$ $= 3{,}327 \cdot 10^{-3}$ cm und $m_s = 3{,}24_4$ mol der Wert von $k_e = 6{,}27_1 \cdot 10^{-5}$ mol/ccm.

Tabelle 3. Die Werte von Dm_s, m_s, z_m und k_e, berechnet für die einzelnen Intervalle:

a) In der Außenkonzentration $C_1 = 1{,}3000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm.

Intervall	Größe von L an den Intervallgrenzen cm	Dm_s mol/Intervall	m_s mol	z_m mol/qcm · Intervall	k_e mol/ccm
	$3{,}191 \cdot 10^{-3}$				
1.		$3{,}24_4 \cdot 10^{-13}$	$3{,}24_4 \cdot 10^{-13}$	$2{,}07_2 \cdot 10^{-8}$	$6{,}27_1 \cdot 10^{-5}$
	3,327				
2.		$3{,}24_4$	$6{,}48_8$	$1{,}98_9$	$11{,}9_6$
	3,463				
3.		$3{,}24_4$	$9{,}73_2$	$1{,}91_2$	$17{,}2_1$
	3,599				
4.		$3{,}24_4$	$12{,}97_6$	$1{,}84_1$	21,91
	3,735				
5.		$3{,}24_4$	$16{,}22_0$	$1{,}77_6$	26,28
	3,871				
6.		$3{,}24_4$	$19{,}46_4$	$1{,}71_4$	30,32
	4,006				
7.		$3{,}24_4$	$22{,}70_8$	$1{,}65_7$	34,04
	4,142				

b) In der Außenkonzentration $C_2 = 1{,}0000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm.

Intervall	Größe von L an den Intervallgrenzen cm	Dm_s mol/Intervall	m_s mol	z_m mol/qcm · Intervall	k_e mol/ccm
	$3{,}995 \cdot 10^{-3}$				
1.		$3{,}136 \cdot 10^{-13}$	$3{,}136 \cdot 10^{-13}$	$1{,}600 \cdot 10^{-8}$	$4{,}672 \cdot 10^{-5}$
	4,166				
2.		3,136	6,272	1,536	8,926
	4,337				
3.		3,136	9,408	1,476	12,82
	4,507				
4.		3,136	12,544	1,422	16,39
	4,678				
5.		3,136	15,680	1,371	19,68
	4,849				
6.		3,136	18,816	1,323	22,72
	5,020				
7.		3,136	21,952	1,279	25,54
	5,191				

8. Diskussion des Rückdehnungsverlaufes.

Die oben bei einer als Beispiel gewählten Zelle errechneten Werte charakteristischer Größen für aufeinanderfolgende Zeitintervalle sollen nun einen tieferen Einblick in die Zusammenhänge des Rückdehnungsvorganges ermöglichen. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die Rückdehnung an sich ja kontinuierlich verläuft und die Einführung von Zeitintervallen nur als Behelf zur Berechnung der Zahlenwerte und Darstellung ihrer Änderungen dient.

Wegen der zeitproportionalen Zunahme der Protoplastenlänge L vergrößert sich auch die Vakuolenoberfläche q, das Vakuolenvolumen V und mit diesem die Menge m_s in gleichlangen Zeitintervallen um denselben Betrag. Da das osmotische Gleichgewicht gewahrt bleibt, permeiert die Menge Dm_s in dem ihr entsprechenden Volumsanteil V_w der Außenlösung ($Dm_s = C \cdot V_w$) in die Vakuole, die sich um dieses Volumen vergrößert: Der Protoplast dehnt sich zurück. Besitzt die Vakuole am Anfang des ersten Intervalls das Volumen V_o, so ist dieses dann am Intervallende $V_o + V_w$. Die Menge Dm_s (die in dem Volumen V_w die Konzentration der Außenlösung besitzt) verteilt sich daher im Volumen $V_o + V_w$ und ihre Konzentration erniedrigt sich auf den Wert k. Bis zum Ende des zweiten Intervalls permeiert wieder eine gleich große Menge Dm_s unter derselben Volumszunahme der Vakuole, wie dies dann auch bei allen folgenden Intervallen eintritt. Zwar erhöht sich hiedurch immer die Konzentration des Diosmotikums

---

Legende zu Abb. 4:

Schematisches Vakuolenvolumen-Konzentrations-Diagramm für drei aufeinanderfolgende Zeitintervalle, dargestellt für den gleichen Protoplasten in zwei verschiedenen Außenkonzentrationen ($C_1 = 1{,}5 \cdot C_2$).

Abszisse: Vakuolenvolumen.
Ordinate: Konzentration.
Fläche: Menge der osmotisch wirksamen Substanz.
V_o Vakuolenvolumen für den Versuchsbeginn.
V_w Volumszunahme der Vakuole pro Intervall.
C_1 und C_2 Außenkonzentrationen des Diosmotikums.
c Partialkonzentration der ursprünglich vorhandenen Substanz in der Vakuole.
k Partialkonzentration der permeierenden Substanz in der Vakuole.
m_u Menge der ursprünglich vorhandenen osmotisch wirksamen Substanz in der Vakuole.
m_s Menge der permeierten Substanz in der Vakuole.
Dm_s die pro Intervall permeierende Menge des Diosmotikums.
Weitere Erklärungen siehe im Text.

im Zellsaftraum, doch erreicht sie nie (d. h. erst für $t = \infty$) den Wert der Außenkonzentration (vgl. die Kolonnen von k_e in Tabelle 3).

Um diese wichtigen Zusammenhänge klarer zu zeigen, sind in der Abbildung 4 die Rückdehnungen in den Konzentrationen C_1 und C_2 ($C_1 = 1{,}5 \cdot C_2$) schematisch dargestellt. Als Abszisse wurde das Vakuolenvolumen gewählt und auf der Ordinate die Konzentrationen der ursprünglich vorhandenen Substanz und der diosmierenden Substanz aufgetragen. Daher gibt die durch die beiden

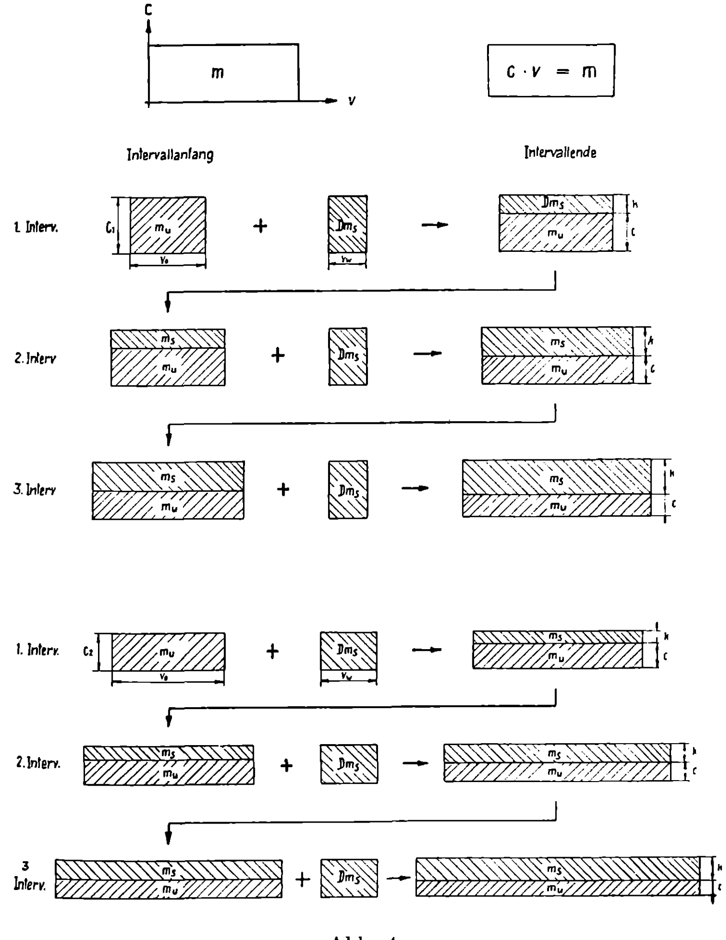


Abb. 4.

Koordinaten bezeichnete Fläche (nach der Beziehung Volumen × × Konzentration = Menge) die Menge an. Flächengleiche Rechtecke repräsentieren dieselbe Menge: Sie kann in einem kleinen Volumen bei hoher Konzentration (kurze Grundlinie und große Höhe des Rechteckes) oder in einem großen Volumen bei geringer Konzentration (lange Grundlinie und geringe Höhe des Rechteckes) enthalten sein. Es werden die Verhältnisse für den Beginn und das Ende von drei aufeinanderfolgenden Intervallen gezeigt. Die Menge m_u der ursprünglich vorhandenen Substanz und die der diosmierenden Substanz m_s bzw. Dm_s) werden durch verschiedene Schraffierung ihrer Flächen gekennzeichnet.

Man erkennt, daß trotz der pro Intervall gleichbleibenden Aufnahme von Dm_s die Partialkonzentration k wegen der Vergrößerung des Vakuolenvolumens immer langsamer ansteigt: Eine zeitproportionale Rückdehnung des Protoplasten bedeutet, daß sich in gleich langen Zeitintervallen die Zunahme der Partialkonzentration des Diosmotikums in der Vakuole verkleinert.

Dieses Verhalten ist bereits aus Gleichung (5) ersichtlich. Die Partialkonzentrationszunahme Dk bei einer Zunahme der Protoplastenlänge $L_1 = L$ um DL auf $L_2 = L + DL$ ist nach dieser Gleichung:

$$Dk = k_2 - k_1 = C \cdot \left(\frac{L + DL - L_o}{L + DL - \frac{b}{3}} - \frac{L - L_o}{L - \frac{b}{3}} \right)$$

und hieraus:

$$Dk = C \cdot \frac{\left(L_o - \frac{b}{3}\right) \; DL}{\left(L - \frac{b}{3}\right) \left(L - \frac{b}{3} + DL\right)}.$$

Da C, L_o, b und für gleich lange Intervalle wegen der Zeitproportionalität auch DL konstant ist, so folgt: Dk nimmt mit größer werdendem L ab.

Der Wert von Dm_s ist bei beiden Konzentrationen annähernd gleich (bei C_1 $3{,}24 \cdot 10^{-13}$ mol; bei C_2 $3{,}13 \cdot 10^{-13}$ mol; Unterschied etwa 4%). Daß diese Differenz klein bleibt, kann aus Formel (1) abgeleitet werden, wenn man für k und q nach Gleichung (5) und (6) einsetzt:

$$\frac{dm}{dt} = K \cdot \pi \cdot b \cdot L \cdot \frac{C \cdot \left(L_o - \frac{b}{3}\right)}{L - \frac{b}{3}}.$$

Das Produkt K π b C $\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)$ ist konstant, und die Änderungen des Quotienten $\frac{L}{L - \frac{b}{3}}$ sind verhältnismäßig gering (für die betrachtete Zelle mit $j \approx 0{,}5$ etwa bis 10%), so daß die bei Konzentrationsänderungen auftretenden Unterschiede von L nur wenig ins Gewicht fallen: Dm_s kann in guter Nährung als konzentrationsunabhängig aufgefaßt werden. Um die geringe Veränderlichkeit von $\frac{L}{L - \frac{b}{3}}$ allgemein zu zeigen, wird wieder (vgl. I. Teil, p. 780) $L = i\ L_0$ und $b = j\ L_0$ eingeführt und die Größe des Quotienten $Q = \frac{i}{i - \frac{j}{3}}$ für einige Werte von i bei verschieden großem Parameter j in der folgenden Tabelle 4 angegeben. Neben Q wird die prozentuale Abweichung $\Delta = \frac{Q_0 - Q}{Q_0} \cdot 100$ angeführt, wobei Q_0 der Wert von Q für $i = 1$ $(L = L_0)$ ist.

Tabelle 4. Änderungen von $Q = \frac{i}{i - \frac{j}{3}}$.

	j = 1,0		j = 0,75		j = 0,50		j = 0,25	
	Q	Δ	Q	Δ	Q	Δ	Q	Δ
1,000	1,500	00,0	1,333	00,0	1,200	00,0	1,091	0,00
1,500	1,286	13,7	1,200	10,0	1,125	6,2	1,059	2,9
2,000	1,200	20,0	1,142	14,5	1,091	9,1	1,044	4,3
2,500	1,154	23,0	1,111	16,6	1,071	10,7	1,035	5,2
3,000	1,125	25,0	1,091	18,3	1,059	11,7	1,029	5,7

Da sich also Dm_s mit der Konzentration und der Protoplastenlänge nur wenig ändert, könnte diese Größe als relatives Maß für die Permeabilität von Zellen gleicher innerer Breite b und gleicher Menge m_u ursprünglich vorhandener Substanz dienen. Bei der höheren Außenkonzentration C_1 ist die gleiche Menge Dm_s in einem geringeren Lösungsvolumen V_w enthalten als bei der niedrigeren Konzentration C_2, das Vakuolenvolumen nimmt daher in ersterem Falle in gleichen Zeitintervallen um ein geringeres Volumen zu: Bei Konzentrationserhöhung der Außenlösung

verkleinert sich die Zunahme des Vakuolenvolumens für gleich lange Zeitintervalle (vgl. auch Fitting 1919, p. 118, der erwähnt, daß aus verhältnismäßig geringen Glyzerinkonzentrationen mehr Glyzerin aufgenommen wird als aus höheren).

Die weitgehende Konzentrationsunabhängigkeit von Dm_s läßt es zunächst gleichgültig erscheinen, in welcher Außenkonzentration die Zelle liegt, um nach gleichen Zeiträumen angenähert die gleiche Menge Dm_s bzw. m_s aufgenommen zu haben: Nach einem Konzentrationswechsel folgt die Rückdehnung in guter Näherung stets derjenigen Geraden, die sich ergibt, wenn die Zelle in einem Einfachversuch unmittelbar in der neuen Konzentration gelegen hätte[8].

Wegen der geringen Varianz kann Dm_s zu einer einfachen Methode für die Transformation einer Rückdehnungsgeraden benutzt werden, wobei unter Transformation die Ermittlung der Rückdehnung einer bestimmten Zelle bei einer Außenkonzentration C_2 aus der bekannten Rückdehnung bei C_1 desselben Diosmotikums verstanden sein soll. Man postuliert zunächst die Gleichheit der während der Zeiten t_0 und t_1 permeierten Mengen Dm_s, so daß gilt:

$$Dm_s = \frac{\pi b^2}{4} \cdot C_1 \cdot (L_{11} - Lo_1) = \frac{\pi b^2}{4} \cdot C_2 \, (L_{12} - Lo_2).$$

Substituiert man nach der Volums-Konzentrationsbeziehung für Lo_2 (d. i. die Protoplastenlänge L_0 in der Konzentration C_2) analog Gleichung (4):

$$Lo_2 = \left(Lo_1 - \frac{b}{3}\right) \cdot \frac{C_1}{C_2} + \frac{b}{3},$$

so folgt schließlich:

$$C_1 \left(L_{11} - \frac{b}{3}\right) = C_2 \cdot \left(L_{12} - \frac{b}{3}\right).$$

Die Transformation einer Rückdehnungsgeraden folgt der einfachen Volums-Konzentrationsbeziehung. Es genügt, für zwei Werte von L diese Berechnung durchzuführen, deren Größe in das Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm einzutragen und durch eine Gerade zu verbinden. Diese stellt dann die durch Transformation aus der Rückdehnung in C_1 gefundene Rückdehnungsgerade bei der Konzentration C_2 dar. Für die als Beispiel gewählte Zelle ist bei $C_1 = 1{,}300 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm bei $t_1 = 3$ min $L_{11} = 11{,}48'$ und für $t_2 = 75$ min $L_{21} = 15{,}00'$ (vgl. Abb. 3); mit $b = 5{,}500'$ wird für $C_2 = 1{,}000 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm nach obiger Beziehung $L_{12} = 14{,}4'$ und $L_{22} = 18{,}9'$. Der Unterschied der zwischen diesen Punkten einzutragenden Geraden und der nach p. 389 tabellarisch berechneten ist derart gering, daß er in Abb. 3 nicht mehr erkennbar ist: Die beiden Geraden überdecken einander. Damit ist die Zulässigkeit dieser einfachen Methode zur Transformation bewiesen, und es kann ihr wohl stets der Vorzug gegenüber der langwierigen Berechnung über den Wert von K gegeben werden; sie ist für Versuche mit Konzentrationswechsel von besonderer Bedeutung.

Diese Überlegungen können am Doppelversuch geprüft werden. Es läßt sich dort aus der Rückdehnung des ersten Teilversuches eine Rückdeh-

[8] Wobei man die Störungen durch das vorerst nach dem Konzentrationswechsel noch fehlende osmotische Gleichgewicht vernachlässigt.

nungsgerade für den zweiten Teilversuch durch Transformation ermitteln, der die Rückdehnung des zweiten Teilversuches (nach Wiedererreichen des osmotischen Gleichgewichtes) folgen muß. Aus dem Beispiel der Abb. 3 erkennt man, daß der experimentell gefundene Rückdehnungsverlauf (interpolierte Rückdehnungsgerade) des zweiten Teilversuches gut mit der durch Transformation gewonnenen (= berechneten) Geraden übereinstimmt. Das Ausmaß dieser Übereinstimmung ermöglicht eine eingehendere Beurteilung eines Doppelversuches, als es der auf p. 386 gezeigte Vergleich von m_u' mit der Summe $m_u + m_s$ darstellt.

Die pro Intervall und Oberflächeneinheit eindringende Menge z_m ist nach Gleichung (1) von der Konzentrationsdifferenz der diosmierenden Substanz zu beiden Seiten des Protoplasten abhängig: $z_m = \frac{Dm_s}{q_m} = K \quad (C - k)$. Für $C - k$ folgt mit dem Wert der Gleichung (5):

$$C - k = C - C \cdot \left(1 - \frac{L_o - \frac{b}{3}}{L - \frac{b}{3}}\right) = C \cdot \frac{L_o - \frac{b}{3}}{L - \frac{b}{3}}.$$

Das Produkt $C \cdot \left(L_o - \frac{b}{3}\right)$, ein relatives Maß für die Menge der ursprünglich vorhandenen Substanz, und der Faktor K sind Konstante. Gelänge es, eine Zelle ohne Veränderung ihrer Permeabilitätseigenschaften bei getrennten Permeabilitätsversuchen in verschiedenen Konzentrationen desselben Diosmotikums zu prüfen, so würde einer gleichen Protoplastenlänge nach obigem Zusammenhang bei allen diesen Konzentrationen stets der gleiche Wert für $C - k$ und z_m entsprechen. Die Konzentrationsdifferenz eines Diosmotikums zu beiden Seiten des Protoplasten und die pro Oberflächeneinheit des Protoplasten und Zeitintervall permeierende Substanzmenge sind für dieselbe Zelle bei gleicher Protoplastenlänge in jeder beliebig hohen Außenkonzentration gleich groß.

Diese Aussage läßt sich an den obigen Tabellen überprüfen, indem man $C - k$ bei gleichem L für beide Konzentrationen errechnet: Am Ende des ersten Intervalls ist bei C_2 $L = 4{,}166 \quad 10^{-3}$ cm; bei C_1 am Ende des 7. Intervalls: $L = 4{,}142 \quad 10^{-3}$ cm; es ergibt sich dann $C_1 - k_1 = 1{,}3000 \cdot 10^{-3} - 0{,}3404 \cdot 10^{-3} = 0{,}9596 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm; $C_2 - k_2 = 1{,}0000 \cdot 10^{-3} - 0{,}0467 \cdot 10^{-3} = 0{,}9533 \cdot 10^{-3}$ mol/ccm. In gleicher Weise stimmen auch die Werte für z_m gut überein ($1{,}65_7 \cdot 10^{-8}$ bzw. $1{,}600 \cdot 10^{-8}$ mol/qcm).

Am Beginn des ersten Intervalls ist in der höheren Außenkonzentration die Konzentrationsdifferenz $C - k$ (bei $k = 0$) größer, und es dringt daher während des Intervalls pro Oberflächeneinheit mehr Substanz in die Vakuole ein, da die von der Konzentration fast unabhängige Menge Dm_s bei der stärkeren Konzentration durch eine kleinere Proto-

plastenoberfläche permeiert. Auch für den Beginn des zweiten Intervalls bleibt C — k bei der höheren Außenkonzentration größer, und dieser Vorsprung erhält sich während des ganzen Versuchsablaufes: Nach gleichen Zeiten, gerechnet vom Beginn der Permeation würde dieselbe Zelle in einer höheren Außenkonzentration stets einen höheren Wert ihrer Konzentrationsdifferenz zu beiden Seiten des Protoplasten zeigen als bei einer niedrigeren Außenkonzentration.

Für jede Außenkonzentration gilt, daß sich während der Rückdehnung die Konzentration k in der Vakuole erhöht, wodurch C — k und damit auch z_m immer kleiner werden. Die pro Oberflächeneinheit und Intervall durchtretende Menge z_m verkleinert sich, indem die gleich groß bleibende Menge Dm_s wegen der Ausdehnung des Protoplasten durch eine immer größer werdende Protoplastenoberfläche permeiert.

Die Kenntnis dieser Zusammenhänge zwischen den Mengen, Konzentrationen und Protoplastenlängen sowie der Änderungen dieser Größen ist für das Verständnis eines Permeabilitätsversuches von besonderer Wichtigkeit. Es gelang hier ohne Schwierigkeiten die Beobachtungen am Versuch und die aus der berechneten Rückdehnungsgeraden abgeleiteten Ergebnisse durch die Grundgleichungen (1) bis (7) zu erklären.

III. Weitere Ergebnisse.

1. Einleitung.

Die hier behandelten Versuche waren zur Prüfung der Zeitproportionalität und Konzentrationsabhängigkeit unternommen worden. Aus der Benutzung der Durchströmungskammer und der häufigen Messung der Protoplastenlängen resultiert der Rückdehnungsverlauf der einzelnen Zelle mit einer wesentlich größeren Genauigkeit als bisher üblich, und es konnten so noch zusätzliche Beobachtungen erfolgen, deren Beschreibung von Interesse zu sein scheint. Eine eingehendere Analyse dieser Ergebnisse bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

2. Die Knicke der Rückdehnungsgeraden, die Anfangskontraktion und die Zwischenkontraktion der Vakuole.

Innerhalb der Rückdehnungen, die von einer einfachen Zeitproportionalität abweichen, nehmen diejenigen, die in ihrem Verlauf eine Knickung besitzen, eine besondere Stellung ein: Die zeitproportionale Rückdehnung ändert bei einem gewissen Wert von L unvermittelt und ohne irgendwelche merkbaren Veränderungen an der Zelle ihre Geschwindigkeit, so daß die inter-

polierte Gerade an dieser Stelle einen Knick aufweist (vgl. Abb. 2 a). Die Meßpunkte liegen dabei derart, daß sich auch kaum eine andere gemeinsame und stetige Kurve zwischen ihnen interpolieren ließe. Meist tritt der Knick im Rückdehnungsverlauf selbst deutlich hervor (vgl. Abb. 5 a), und nur selten findet man einen allmählichen Übergang auf den geänderten Wert der Rückdehnungsgeschwindigkeit. Die Häufigkeit dieser Erscheinung ist, wenn man die ersten Rückdehnungen (vgl. p. 381) betrachtet, dort geringer (5 von 92 der zeitproportional beurteilten Rückdehnungen) als bei den zweiten und folgenden Rückdehnungen von Mehrfachversuchen (von insgesamt 60 zeigen 13 Rückdehnungen einen Knick). Auch überwiegen bei letzteren die Fälle, in welchen sich die Rückdehnung nach dem Knick verlangsamt (11 von den insgesamt 13 Rückdehnungen), während bei den ersten Rückdehnungen dieses Verhältnis etwa gleich zu sein scheint (2 Erniedrigungen gegenüber 3 Erhöhungen).

Vielleicht deutet dieses Verhalten an, daß eine intensivere Einwirkung des Milieus, wie sie während eines Mehrfachversuches vorliegt, das Auftreten plötzlicher Änderungen der Rückdehnungsgeschwindigkeit begünstigt. Eine ausreichende Erklärung dieser Erscheinung kann noch nicht gegeben werden, doch läßt sie sich am leichtesten aus entsprechenden Änderungen der Protoplastenpermeabilität ableiten. Das überwiegende Auftreten einer Verkleinerung der Rückdehnungsgeschwindigkeit bei den Mehrfachversuchen würde dann eine plötzliche Erniedrigung der Permeabilität anzeigen. Eine Verringerung der Permeabilität durch die Versuchseinwirkungen wurde auf breiter Basis schon mehrfach untersucht (vgl. Huber und Schmidt 1933, Schmidt 1936) und ließe sich auch hier, zwar für einen nur relativ geringen Teil der untersuchten Zellen, zeigen. Immerhin scheinen diese sprunghaften Änderungen der Rückdehnungsgeschwindigkeit genügend experimentell belegt, um sie nicht als sekundär entstanden aufzufassen.

Nach Vorplasmolyse mit einer äquimolaren Glukoselösung kann man oft eine Eindellung der prallen Protoplastenkuppen und manchmal sogar deren plötzliche Kontraktion erkennen, die unmittelbar nach dem Milieuwechsel in der Lösung des Diosmotikums (Harnstoff) einsetzt (vgl. Abb. 1 f und Abb. 5 b).

Die Dauer dieser als Anfangskontraktion bezeichneten Erscheinung beträgt meist nur wenige Sekunden, und der Protoplast dehnt sich dann wieder zurück; dies erfolgt anfangs sehr schnell, wird später aber immer langsamer und geht nach etwa 3 bis 8 Minuten (selten später) in eine zeitproportionale Rück-

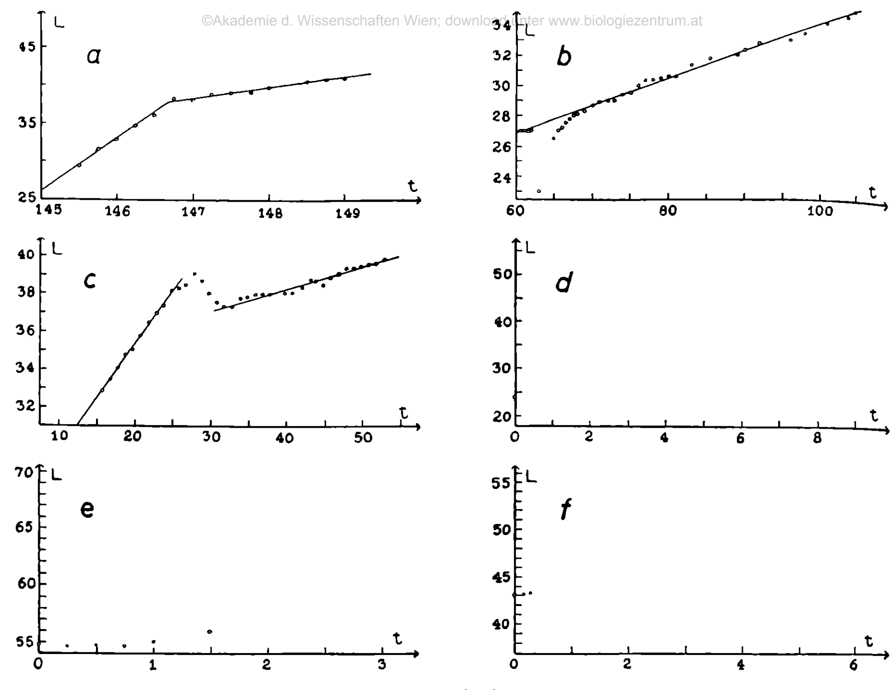


Abb. 5. Beispiele für atypische Rückdehnungen.

Diagramm a: Knickstelle im Rückdehnungsverlauf.
Taraxacum off., Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 43,0′; b = 5,0′;
Harnstoff, 0,8-molar; Zweite Rückdehnung eines Mehrfachversuches.

Diagramm b: Anfangskontraktion der Vakuole.
Sonchus laciniatus, Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 40,5′; b = 4,5′;
Harnstoff, 1,0-molar; Vorplasmolyse mit 1,0-molarer Glukose.

Diagramm c: Zwischenkontraktion der Vakuole.
Taraxacum off., Blattrippenoberseite;
Epidermiszelle; h = 42,5′; b = 5,3′;
Harnstoff, 1,3-molar; vorher 40 min gewässert.

Diagramm d—f: Permeabilitätserhöhung durch Äthylenglykol.

Diagramm d: Zebrina pendula, Stengel;
Epidermiszelle; h = 58′; b = 10,5′;
Äthylenglykol, 0,5-molar; Vorplasmolyse mit 0,5-molarer Glukose.

Diagramm e: Zebrina pendula, Stengel;
Parenchymzelle; h = 80,0′; b = 19,5′;
Äthylenglykol, 0,4-molar; Vorplasmolyse mit 0,4-molarer Glukose.

Diagramm f: Allium cepa, Zwiebelschuppe;
Zelle der Außenepidermis; h = 61,5′; b = 10,0′;
Äthylenglykol, 0,5-molar; Vosplasmolyse mit 0,5-molarer Glukose

Abszissen: Zeit in Minuten; Ordinaten: Protoplastenlänge in ′; 1′ = 2,78 μ; (für Diagramm c: 1′ = 2,1 μ); h = innere Zellänge; b = innere Zellbreite.

dehnung über. Manchmal war dies auch bei den späteren (d. h. zweiten usf.) Rückdehnungen von Mehrfachversuchen zu bemerken, wobei die Kontraktion erfolgte, sobald von Glukose (vgl. p. 404) auf die äquimolare Harnstofflösung gewechselt wurde.

Eine Erklärung dieses Verhaltens als partielle Plasmolyse, entstehend aus einer ungenügenden Isotonie zwischen Plasmolytikum und Diosmotikum, ist nicht möglich, da die Rückdehnung nicht unmittelbar zeitproportional einsetzt und der aus ihrem späteren Verlauf extrapolierte L_0-Wert gut mit dem aus der Vorplasmolyse gefundenen übereinstimmt. Wie mir Herr Professor Höfler in dankenswerter Weise mitteilte, hat auch Herr Casari dieses Phänomen beobachtet und erklärt es mit einer gegenüber der Glukose rascheren Permeation des Harnstoffes durch die Zellwand. Dadurch erhöht sich unmittelbar nach dem Milieuwechsel im Vorraum zwischen Zellquerwand und Plasmakuppen die Konzentration der Außenlösung und entzieht dem nunmehr hypotonischen Zellsaft Wasser: Der Protoplast kontrahiert sich. Ist alle Glukose durch die Zellwand in die Außenlösung ausgetreten, so dehnt sich der gegen seine Umgebung nunmehr hypertonisch gewordene Protoplast schneller aus, als der Harnstoffpermeation entspricht, und beginnt die zeitproportionale Rückdehnung erst, wenn das osmotische Gleichgewicht zwischen Außenlösung und Vakuole wieder hergestellt ist.

Wechselt man umgekehrt vom Diosmotikum auf eine äquimolare Glukoselösung, so müßte das inverse Verhalten beobachtet werden, da wegen des schnelleren Austritts des Harnstoffes aus dem Vorraum dort die Größe der Außenkonzentration vorerst nicht erreicht wird: Der Protoplast dehnt sich für ganz kurze Zeit aus, und die anschließende Kontraktion erfolgt zunächst schneller, als dem Exosmosevorgang entspricht. Dieses Phänomen war bei den Mehrfachversuchen aber nicht beobachtbar, weil stets abgewartet wurde bis der Protoplast das gesamte Zellumen ausfüllte.

Unter den 14 Zellen, deren erste Rückdehnung nicht zeitproportional beurteilt wurde, zeigten 6 Zellen zwar anfangs Zeitproportionalität, doch kontrahiert sich plötzlich und ohne sichtbare Veränderungen der Protoplast. Später setzt dann die Rückdehnung meist zeitproportional und langsamer wieder ein (vgl. Abb. 5 c). Diese hier als Zwischenkontraktion bezeichnete Erscheinung könnte durch eine spontane Exosmose von im Zellsaft ursprünglich vorhandener osmotisch wirksamer Substanz entstehen, wobei durch die Kontraktion das osmotische Gleichgewicht zwischen Zellsaft und Außenlösung erhalten bleibt. Wegen der Exosmose verlangsamt sich bei gleichbleibender Größe

von K die Rückdehnung, wie dies auch aus Gleichung (7) hervorgeht, wenn der Wert für $\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)$ kleiner wird.

Bei den übrigen 8 Zellen nimmt die Rückdehnungsgeschwindigkeit meist stetig ab, doch ist in einzelnen Fällen auch ein stufenförmiger Verlauf zu erkennen, was sich beides durch eine entsprechende Exosmose ursprünglich vorhandener Substanz während der ganzen Dauer der Rückdehnung erklären ließe.

3. Die Mehrfachversuche.

Durch Mehrfachversuche ohne Konzentrationswechsel (zur Beschreibung ihrer Technik vgl. p. 2 u. 3) sollte ein allfälliger Einfluß des Versuchsgeschehens auf die Permeabilität zu erkennen sein: Wird durch das Experiment die Protoplastenpermeabilität tatsächlich geändert, so sind bei den zweiten, dritten und folgenden Rückdehnungen Unregelmäßigkeiten oder Geschwindigkeitsänderungen zu erwarten, die um so ausgeprägter auftreten müßten, je länger der Versuch dauert.

Von den insgesamt elf untersuchten Zellen zeigten nur zwei je eine unregelmäßige Rückdehnung. Bei einer weiteren war die erste Rückdehnung noch nicht protokolliert. so daß bei insgesamt acht Zellen der Faktor K für die einzelnen Rückdehnungen berechnet werden konnte. Seine Änderungen sind aus der Tabelle 5 ersichtlich. Wo ein Knick auftrat (bei je zwei zweiten und dritten Rückdehnungen), wurde für den vor und den nach dem Knickpunkt befindlichen Teil der Geraden je ein Wert für K berechnet. Ersterer ist mit dem des vorangegangenen und letzterer mit dem des nachfolgenden Permeabilitätsversuches verglichen.

Tabelle 5. Änderungen von K bei Mehrfachversuchen ohne Konzentrationswechsel.

Vergleich der Rückdehnungen	Gesamtzahl der Zellen	Anzahl der Zellen, bei welchen sich K ändert um			
		0—10%	11—31%	32—80%	über 80%
1 und 2	8	2	3	2	1
2 und 3	8	3	4	1	0
3 und 4 .	1	0	1	0	0
Summe		13		4	

Da wegen der starken Abhängigkeit des Faktors K von der Steigung der Rückdehnungsgeraden noch Änderungen bis 31% zulässig erscheinen, so zeigen kaum ein Viertel der Permeabilitätsversuche stärkere Abweichungen vom Verlauf des jeweils vorangegangenen.

Von Interesse ist auch eine analoge Gegenüberstellung der Werte für $\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)$ als mittelbares Maß der Menge der ursprünglich vorhandenen Substanz (vgl. Formel 4): Ihre am Beginn des Permeabilitätsversuches gefundene Größe muß auch am Schluß des nachfolgenden Exosmoseversuches erreicht werden. Ist dieser zweite Wert höher bzw. niedriger, so könnte Unvollständigkeit der Exosmose oder Anatonose bzw. Exosmose ursprünglich vorhandener Substanz oder Katatonose als Ursache in Betracht kommen. Es zeigte sich nun, daß bei 14 von den insgesamt 17 Vergleichen die beiden Werte um höchstens 10% voneinander abweichen und demnach eine sehr gute Übereinstimmung aufweisen. Bei fünf Fällen stieg der zweite Wert für $\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)$ leicht an, während er in den übrigen zwölf den ersten Wert nicht mehr erreichte. Dies beruht sehr wahrscheinlich auf der Exosmose geringer Mengen ursprünglich vorhandener Substanz, die demnach relativ häufig auftreten würde.

Nach diesen Resultaten beeinflussen die Mehrfachversuche ohne Konzentrationswechsel (in welchen neben den relativ rasch verlaufenden Permeabilitätsversuchen die wesentlich längerdauernden Exosmosen inbegriffen sind) die Protoplastenpermeabilität meist nur wenig, und auch die Menge der ursprünglich vorhandenen Substanz zeigt keine wesentlichen Veränderungen.

Aus obigem Verhalten läßt sich ein für die Einfachversuche wichtiger Hinweis ableiten. Die Versuchsdauer, das heißt die Einwirkungszeit des fremdartigen Milieus, ist dort noch wesentlich kürzer als bei den Mehrfachversuchen, so daß mit um so größerer Sicherheit für das hier benutzte Diosmotikum (Harnstoff) angenommen werden kann: Durch die beim Einfachversuch auftretenden experimentellen Einwirkungen wird die Protoplastenpermeabilität in der Regel nicht verändert.

Weitere Mehrfachversuche wurden mit Konzentrationswechsel ausgeführt. Diese erfolgten alternierend, so daß z. B. die erste Rückdehnung in 1,0 molarem Harnstoff, die zweite in 1,7 molarem, die dritte in 1,0 molarem, die vierte in 1,7 molarem usf. beobachtet wurde. Bei den dazwischenliegenden

Exosmosen wurde die partielle Plasmolyse bzw. Deplasmolyse entweder direkt an die Rückdehnung angeschlossen (Milieuwechsel unmittelbar auf die der nächsten Harnstoffkonzentration äquimolare Glukoselösung) oder erfolgte erst nach der Exosmose (Milieuwechsel auf äquimolare Glukose, in welcher die Exosmose abgewartet wurde und erst dann Konzentrationswechsel auf die für die nächste Rückdehnung äquimolare Glukoselösung). Die Ergebnisse dieser Versuche sind wieder in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 6. Änderungen von K bei Mehrfachversuchen mit Konzentrationswechsel.

Vergleich der Rückdehnungen	Gesamtzahl der Zellen	Anzahl der Zellen, bei welchen sich K ändert um			
		0—10%	11—31%	32—80%	über 80%
1 und 2	18	2	3	12	1
2 und 3	4	0	1	2	1
3 und 4 und weitere	9	0	2	5	
Summe .		8		23	

Fast zwei Drittel (23 von 31) obiger Vergleiche zeigen somit Abweichungen der K-Werte für aufeinanderfolgende Rückdehnungen, die 31% übersteigen. Demgegenüber streuen die Werte von $\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)$ C als relatives Maß für die Menge der ursprünglich vorhandenen Substanz etwa im gleichen Ausmaß wie bei den Versuchen ohne Konzentrationswechsel.

Die starken Schwankungen des Faktors K sind offenbar durch die Konzentrationswechsel ausgelöst, die hier zu den bisher beschriebenen Versuchseinwirkungen neu hinzukommen. Sehr wahrscheinlich sind sie der Ausdruck entsprechender Änderungen der Protoplasmapermeabilität selbst[9]. Das Zusammentreffen von Konzentrationswechsel und Milieuwechsel im gleichen Versuch scheint demnach den Protoplasten bereits derart

[9] Die Möglichkeit, daß die dem Berechnungsgang zugrunde liegende Konzentrationsabhängigkeit der Rückdehnung (vgl. p. 385) unrichtig wäre, ist durch die Ergebnisse der Doppelversuche, die diese Beziehung quantitativ bestätigen, wohl auszuschließen.

anzugreifen, daß Veränderungen seiner Permeabilität ausgelöst werden. Immerhin ist diese Größe von einem alleinigen Wechsel des Milieus oder der Konzentration nur wenig beeinflußt, wie aus der guten Übereinstimmung der aus den verschiedenen Rückdehnungen abgeleiteten K-Werte bei den Doppelversuchen und bei den Mehrfachversuchen ohne Konzentrationswechsel hervorgeht.

4. Versuche mit Äthylenglykol.

Eine kurze Prüfung dieser Substanz erschien von Interesse, da bereits Hofmeister (1935) auf ihre permeabilitätserhöhende Wirkung hinwies und sie unlängst zu Versuchen verwendet wurde, bei welchen es sich um die experimentelle Bestätigung eines mathematisch abgeleiteten Maßes für die Wasserpermeabilität handelt (Bochsler 1948).

Es wurden insgesamt 13 Einfachversuche (Objekte *Allium cepa* und *Zebrina pendula*) ausgeführt, von welchen nur drei einen zeitproportionalen Verlauf aufwiesen, während sich bei den übrigen die Rückdehnungsgeschwindigkeit im Laufe der Zeit mehr oder weniger unregelmäßig erhöht (vgl. Abb. 5 d, e und f). Die Versuche bestätigen somit die Permeabilitätserhöhung und zeigen, daß zur Ermittlung der Permeabilität für Äthylenglykol, wenn überhaupt, so nur der Anfangsteil der Rückdehnung dienen kann, doch sind auch dann noch die Ergebnisse mit Vorbehalt zu bewerten. Für Versuche, mit deren Hilfe theoretische Ableitungen geprüft werden sollen, ist Äthylenglykol jedenfalls ungeeignet, da die sekundären Änderungen der Protoplasmadurchlässigkeit, die diese Substanz selbst hervorruft, den Rückdehnungsverlauf beeinflußt.

Die hier behandelten Versuche wurden in den Jahren 1945 bis 1949 am Botanischen Institut der Universität Innsbruck ausgeführt. Ich danke Herrn Prof. A. Sperlich und Herrn Prof. A. Pisek für die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie für das große Interesse und das außerordentliche Entgegenkommen, diese Arbeit trotz längerer Unterbrechungen fertigstellen zu können. Meinem hochgeschätzten Lehrer, Herrn Prof. K. Höfler, Wien, schulde ich für sein Interesse und zahlreiche wertvolle Hinweise besonderen Dank.

Zusammenfassung.

Für einen Permeabilitätsversuch nach dem Totalverfahren (das heißt, die Außenlösung enthält nur das Diosmotikum) ließ sich im ersten Teil dieser Arbeit (Stadelmann 1952) als Endgleichung für das Permeabilitätsmaß K die Gleichung

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \cdot \frac{L_2}{L_1}}{\left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot (t_2 - t_1)} \tag{7}$$

(L = Protoplastenlänge, b = Zellbreite, t = Zeit) ableiten, aus welcher folgt, daß die Rückdehnung zeitproportional verläuft und sich bei einer Konzentrationserhöhung verlangsamt. Diese Aussagen wurden hier mittels dreier Varianten des Permeabilitätsversuches (Einfach-, Doppel- und Mehrfachversuch) geprüft: Bei verschiedenartigem Zellmaterial waren mehr als 80% der Rückdehnungen zeitproportional. Die Konzentrationsabhängigkeit läßt sich an den Ergebnissen von Doppelversuchen beurteilen. Für die zwar geringe Zahl dieser Versuche bestätigen die Rückdehnungen gut den aus der Gleichung (7) abgeleiteten Zusammenhang.

Es ist zu empfehlen, den Wert von L_0 (Protoplastenlänge für den Versuchsbeginn), der in obiger Gleichung einzusetzen ist, statt in einem separaten Plasmolyseversuch aus dem Rückdehnungsverlauf selbst abzuleiten (Extrapolationsmethode).

Als Berechnungsbeispiel für den Faktor K wird dieser aus beiden Teilversuchen eines Doppelversuches bestimmt. Mit seinem Wert und den übrigen Versuchsgrößen (Außenkonzentration. Menge der ursprünglich vorhandenen Substanz, Zellbreite) läßt sich dann aus der entsprechend umgeformten Gleichung (7) ein Rückdehnungsverlauf für beide Konzentrationen rechnerisch ermitteln. Dieser weicht vom experimentell gefundenen nur unwesentlich ab.

Bei beiden so berechneten Rückdehnungen wurden für mehrere aufeinanderfolgende gleich lange Zeitintervalle einige für den Versuchsablauf charakteristische Größen (die pro Einheit der Protoplastenoberfläche permeierte mittlere Menge, Partialkonzentration und Menge des Diosmotikums in der Vakuole) bestimmt. Ihre zeitlichen Änderungen und ihre Abhängigkeit von der Größe der Außenkonzentration ließen hieraus unter anderem die folgenden allgemeinen Zusammenhänge ableiten. Sie gelten jeweils für dieselbe Zelle und beliebige Konzentrationen eines Diosmotikums.

1. Bei zeitproportionaler Rückdehnung verkleinert sich die Partionalkonzentrationszunahme des Diosmotikums in der Vakuole für aufeinanderfolgende und gleich lange Zeitintervalle.

2. Die Menge des während gleich langer und genügend kurzer Zeitintervalle in die Vakuole eindringenden Diosmotikums ist angenähert konstant.

Sie ist unabhängig von der momentanen Protoplastenlänge und nur wenig abhängig von der Höhe der Außenkonzentration.

3. Die Konzentrationsdifferenz des Diosmotikums an beiden Seiten des Protoplasten (und damit die pro Oberflächeneinheit und Zeitintervall permeierende Substanzmenge) ist bei gleicher Protoplastenlänge für jede beliebige Höhe der Außenkonzentration dieselbe.

Anschließend sind einige Abweichungen vom typischen Rückdehnungsverlauf beschrieben, die bei einer jeweils geringen Zahl von Zellen beobachtet wurden:

a) Knicke der Rückdehnungsgeraden. Die Rückdehnung ändert plötzlich ihre Geschwindigkeit, und zwar derart, daß sie einer abgeknickten Geraden folgt. Dieses Verhalten ist möglicherweise auf eine spontane Permeabilitätsänderung zurückzuführen.

b) Anfangskontraktion der Vakuole. Schockartige und sehr kurzzeitige Kontraktion des Protoplasten von mit Glukose vorplasmolisierten Zellen, sobald sie in das äquimolare Diosmotikum (Harnstoff) gelangen, erklärbar aus einer gegenüber Glukose höheren Durchlässigkeit der Zellwand für Harnstoff.

c) Zwischenkontraktion der Vakuole. Der Protoplast dehnt sich normal zurück, kontrahiert sich plötzlich und setzt dann die Rückdehnung wieder zeitproportional, aber meist langsamer fort; sie ist möglicherweise auf eine momentane Exosmose ursprünglich vorhandener Substanz zurückzuführen.

Der Vergleich von Mehrfachversuchen mit Konzentrationswechsel, solchen ohne Konzentrationswechsel und Doppelversuchen zeigt, daß Milieuänderungen oder Konzentrationsänderungen allein die Größe der Rückdehnungsgeschwindigkeit kaum beeinflussen, gemeinsam im selben Versuch vorkommend, diese jedoch stark ändern können.

Einige Versuche mit Äthylenglykol bestätigen die bereits bekannte permeabilitätserhöhende Wirkung dieser Substanz.

Literaturverzeichnis.

Bochsler, A., 1948: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas auf Grund des Fickschen Diffusionsgesetzes. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **58**, 73 und Büchler u. Co., Bern.

Bogen, H. J., 1937: Über die Ursachen der Unterschiede in der „spezifischen" Harnstoffpermeabilität. (Vorl. Mitteilung.) Planta, **27**, 611.

— 1938: Untersuchungen zu den spezifischen Permeabilitätsreihen Höflers. II. Harnstoff und Glycerin. Planta, **28**, 535.

Bogen, H. J., 1940: Untersuchungen über den Quellungseffekt permeierender Anelektrolyte. I. Ionenwirkungen auf die Permeabilität von *Rhoeo discolor*. Zeitschr. f. Bot., **36**, 65.
— 1941: Untersuchungen über den Quellungseffekt permeierender Anelektrolyte. II. Ionenwirkung auf die Permeabilität von *Gentiana cruciata*. Planta, **32**, 150.
Collander, R. und Bärlund, H., 1933: Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla*. II. Die Permeabilität für Nichtelektrolyte. Acta Bot. Fenn., **11**, 1.
Collander, R., 1949: The Permeability of Plant Protoplasts to Small Molecules. Physiol. Plantar., **2**, 300.
Fitting, H., 1919: Untersuchungen über die Aufnahme und über anomale osmotische Koeffizienten von Glycerin und Harnstoff. Jahrb. wiss. Bot., **59**, 1.
Höfler, K., 1934: Permeabilitätsstudien an Stengelzellen von *Majanthemum bifolium*. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., I. Abt., **143**, 213.
Hofmeister, L., 1935: Vergleichende Untersuchungen über spezifische Permeabilitätsreihen. Bibliotheca Botanica, **113**, 1.
— 1948: Über die Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., I. Abt., **157**, 83.
Huber, B. und Schmidt, H., 1933: Plasmolyse und Permeabilität. Protoplasma, **20**, 203.
Kreuz, J., 1941: Der Einfluß von Calzium- und Kalium-Salzen auf die Permeabilität des Protoplasmas für Harnstoff und Glycerin. Österr. Bot. Zeitschr., **90**, 1.
Rottenburg, W., 1943: Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glycerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Flora, N. F. **37**, 230.
Schmidt, H., 1936: Plasmolyse und Permeabilität. Jahrb. wiss. Bot., **83**, 470.
Stadelmann, E., 1951 a: Eine verbesserte Durchströmungskammer und deren Anwendung zur Prüfung eines Maßes für die Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. Diss. Univ. Innsbruck.
— 1951 b: Eine verbesserte Durchströmungskammer. Protoplasma, **40**, 617.
— 1952: Zur Messung der Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. I. Die mathematische Ableitung eines Permeabilitätsmaßes für Anelektrolyte. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., I. Abt., **160**, 761.
Url, W., 1951: Permeabilitätsverteilung in den Zellen des Stengels von *Taraxacum officinale* und anderer krautiger Pflanzen. Protoplasma **40**, 475.
Vries, De. H., 1889: Über die Permeabilität der Protoplaste für Harnstoff. Bot. Ztg., **47**, 309.

Berichtigung: Im I. Teil hat es auf Seite 782 am Ende des ersten Absatzes statt „vernachlässigen" richtig „vereinfachen" zu heißen.